はじめてのリアルタイム PCR

１．はじめに

リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングし、解析する技術です。エンドポイントで PCR 増幅産物を確認する従来の PCR 法に比べて、

①DNA や RNA の正確な定量ができること、

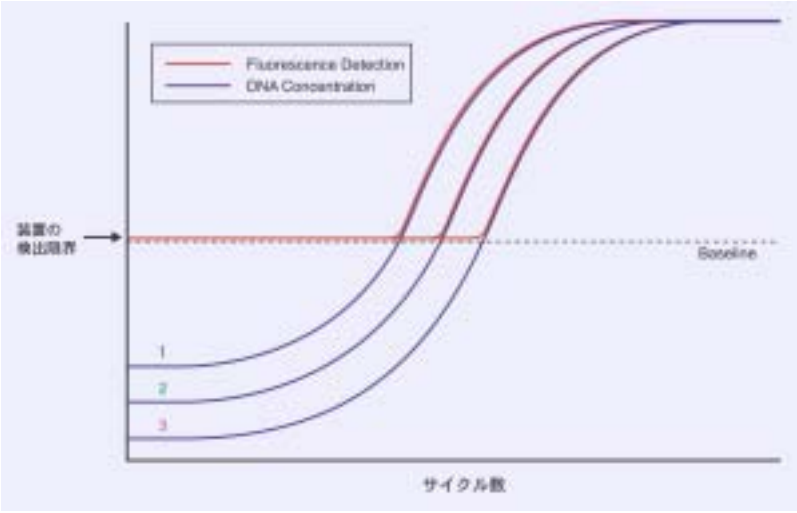
②電気泳動が不要なので迅速かつ簡便に解析できコンタミネーションの危険性も小さいこと、

など多くの利点があります。今や、遺伝子発現解析や SNP のタイピングなどには欠かせないツールとなりました。ここでは、はじめてリアルタイム PCR 実験をされる方を対象に、リアルタイム PCR 法の原理や実験・解析手法などを簡単に解説します。

２．リアルタイム PCR による定量の原理

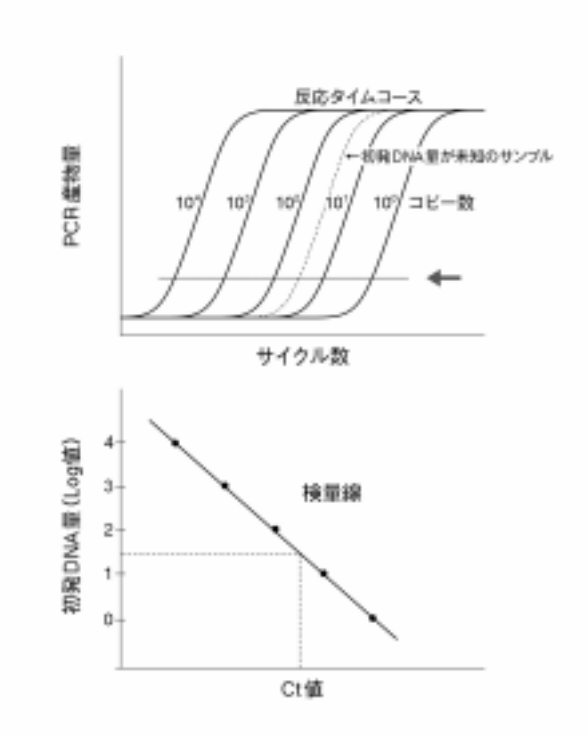
まずは、リアルタイム PCR による定量の仕組みを見ていきましょう。リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし指数関数的増幅領域で定量を行うため、従来技術の RT-PCR 法などとは異なり、PCR の増幅速度論に基づいた正確な定量が可能です。

PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、2 倍、・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子をリアルタイムモニタリングした図が増幅曲線です。下の模式図では、DNA 濃度（実際の増幅産物量）を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示しました。PCR 増幅産物量が蛍光検出できる量に達すると増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達します。



初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量が検出可能な量に達するサイクル数は少なくて済みますので、増幅曲線が早く立ち上がってきます。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR 反応を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。ここで、適当なところに閾値（Threshold）を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値（Threshold Cycle）が算出されます。

Ct 値と初期鋳型量の間には直線関係があり、下図のような検量線を作成することができます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができます。



３．リアルタイム PCR 装置と検出方法

では、リアルタイム PCR では、どのようにしてチューブ内の PCR 増幅産物を検出するのでしょうか。ここでは、リアルタイム PCR 装置と PCR 増幅産物の検出方法について解説します。

装置

リアルタイム PCR を行うには、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイム PCR 専用装置が必要です。 サーマルサイクラーで DNA を PCR 増幅しつつ、分光蛍光光度計でその増幅産物をモニタリングしていきます。リアルタイム PCR 装置はさまざまな機種が販売されており、96 ウェルのプレート単位で反応できるもの（Thermal Cycler Dice Real Time System 他）や、高速で PCR 反応が行えるように工夫されたもの（Smart Cycler System 他）など、それぞれ特性を備えています。

Thermal Cycler Dice Real Time System

（タカラバイオ）

Applied Biosystems 7500
リアルタイム PCR システム

(Applied Biosystems 社)

LightCycler

(Roche Diagnostics 社)

Smart Cycler

(Cephied 社)

検出方法の選択

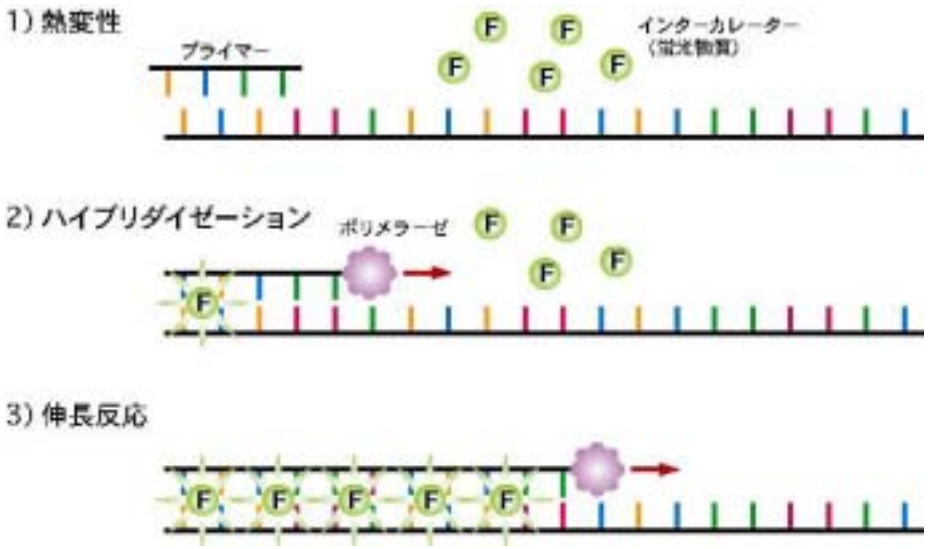
リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光により検出します。検出方法は、大きく分けてインターカレーターを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種類があります。インターカレーター法は、二本鎖 DNA をすべて検出するため遺伝子ごとにプローブを用意する必要がありません。実験コストが安く反応系の構築も容易なのが長所ですが、検出特異性はあまり高くありません。 一方、蛍光標識プローブを用いる方法は、コストは高くつきますが、検出特異性が高いので相同性の高い配列同士も区別して検出できます。検出方法は、実験の目的に応じて選択します。

検出方法の原理

蛍光標識プローブにはいくつかの種類がありますが、ここでは、TaqMan プローブとサイクリングプローブを紹介します。インターカレーター法には、一般的に SYBR Green I を使用します。

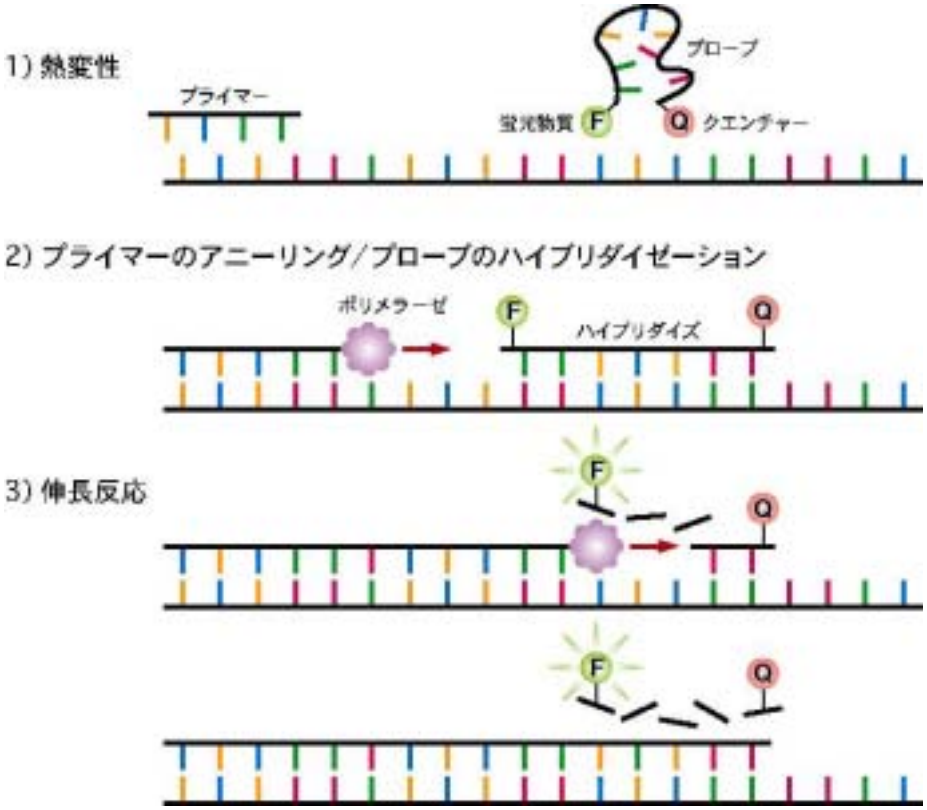
（1）インターカレーター法（SYBR Green I）

SYBR Green I は、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター）です。インターカレーターは、PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発します。この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターできます。



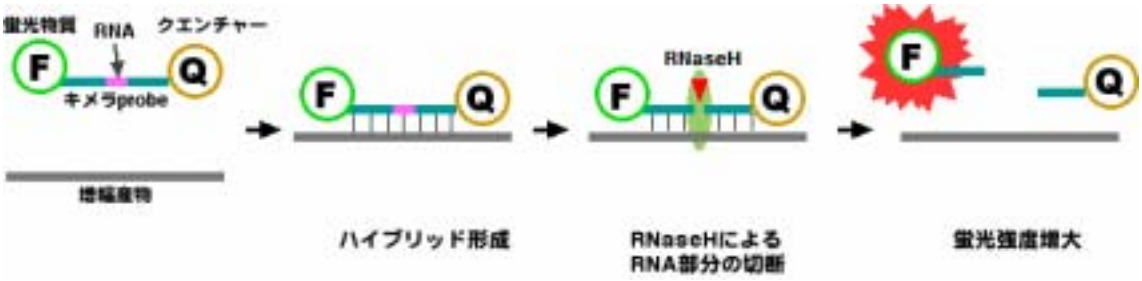
（２）TaqMan プローブ

5’末端を蛍光物質で、3’末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる方法です。TaqMan プローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズしますが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されます。伸長反応ステップのときに、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5’→ 3’エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズした TaqMan プローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光が発せられます。



（3）サイクリングプローブ

サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法です。プローブは一方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより強い蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNaseH により RNA 部分が切断されると、強い蛍光を発するようになります。また、サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNaseH による切断は起こりませんので、非常に配列特異性の高い検出方法であり、SNPs タイピングなどに最適です。



4．プライマー設計

リアルタイム PCR 実験の第一ステップは、目的の遺伝子を検出できるプライマー（およびプローブ）の入手です。専用ソフトウェアを用いて自分で設計する他に、設計済みのものを購入して使用することもできます。

プライマー設計は、リアルタイム PCR を成功させるためにもっとも重要なステップです。PCR 増幅効率が悪いプライマーでは高感度検出ができませんし、プライマーダイマーなどの非特異的増幅が起こりやすいようなプライマーでは正確な定量が困難です。プライマー設計専用のソフトウェアを用いて、下記の条件を満たすようなプライマーを設計しましょう。

・標的の DNA 配列に安定してアニーリングできる（Tm 値が適切な範囲である）
・PCR 反応効率が良い（プライマー内部やプライマー間に相補的な配列がない）
・特異性が高い（鋳型 DNA 上にミスプライミングする部位がない）

＊詳しくは、「プライマー設計のガイドライン」をご参照ください。

Perfect Real Time サポートシステムは、このような条件を考慮して設計されたプライマー（インターカレーター法によるリアルタイム RT-PCR 用）をカスタム合成するサービスです。ヒト、マウス、ラットの RefSeq について多くのプライマーセットが用意されていますので、リストから選んで購入するだけですぐに実験できる便利なシステムです。市販のプライマーやカスタム設計サービスも上手にご利用ください。

なお、検出に蛍光標識プローブを使用する場合には、プライマーとプローブの相互作用が検出効率に大きく影響することがありますので、プライマーとプローブを同時に設計するようにします。設計の方法はプローブの種類によって異なり、それぞれ専用のソフトウェアが用いられます。

5．実験プロトコール

リアルタイム PCR 実験は、実際にはここに示すような方法で行います。ここでは、SYBR Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR の操作方法を紹介します。

用意するもの（主なもの）

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
リアルタイム PCR 用プライマー
リアルタイム PCR 用試薬
鋳型 total RNA
マイクロピペットおよびチップ

プロトコール

・リアルタイム PCR 装置によりプロトコールが異なります。
以下のワークシートをダウンロードしてご利用ください。

（右クリック(Windows)または Control キーを押しながらクリック(Macintosh)し、“ 対象ファイルに保存 ” や ” Save Link As... “ 等を選択してダウンロードしてください。）

ワークシート (Thermal Cycler Dice Real Time System を使用する場合)
ワークシート (Smart Cycler II System を使用する場合)
ワークシート (ABI PRISM 7000 / 7700 / 7900HT 及び 7300 / 7500 Real-Time PCR System；96-well タイプを使用する場合)
ワークシート (ABI PRISM 7900HT；384-well タイプを使用する場合)
ワークシート (7500 Fast Real-Time System を使用する場合)
ワークシート (Mx3000P を使用する場合)
ワークシート (LightCycler を使用する場合)

・操作方法の詳細は、リアルタイム PCR 試薬の取扱説明書およびご使用のリアルタイム PCR 装置の説明書でご確認ください。

注意事項

・RNA を取扱うときは、グローブとマスクをしてください。
・反応液を調製するときは、必要本数＋αのマスターミックスを用意して分注します。
・PCR 反応液への逆転写反応液の持込は、PCR 容量の 10%を超えないようにします。

6．解析方法　－相対定量－

リアルタイム PCR 実験により定量結果が得られたら、これらの結果を解析して相対量を求めます。解析ソフトウェアによっては、一連の作業が自動化されているものもありますが、解析手順を一度、確認しておきましょう。

ある遺伝子の mRNA 発現量を異なるサンプル間で比較するには、目的の遺伝子の他にハウスキーピング遺伝子も同時に測定して相対定量を行います。ハウスキーピング遺伝子の測定値により RNA 量を補正することで、サンプル間の正確な比較ができます。ここでは、具体例を交えながら、相対定量の手順について解説します。

（1）実験例

3 種の RNA サンプルについて、遺伝子 X の mRNA 発現量を比較する。

発現量を測定する遺伝子：
遺伝子 X：解析目的遺伝子
遺伝子 H：ハウスキーピング遺伝子

RNA サンプル：
A、B、C の 3 種

（2）リアルタイム PCR 反応と定量結果

遺伝子 X と遺伝子 H のそれぞれについて検量線を作成し、未知サンプルの定量を行います。下表に反応例とその結果をまとめました。6 段階濃度のスタンダードを用いて検量線を作成し、そこに RNA サンプル A、B、C の Ct 値を当てはめて定量した結果です。

	遺伝子 X			遺伝子 H		
	既知量	Ct	定量結果*1	既知量	Ct	定量結果*1
スタンダード 1	1	35.66	-	1	37.46	-
スタンダード 2	10	32.77	-	10	33.06	-
スタンダード 3	100	29.20	-	100	29.69	-
スタンダード 4	1000	25.75	-	1000	26.10	-
スタンダード 5	10000	22.06	-	10000	22.51	-
スタンダード 6	100000	18.62	-	100000	18.88	-
RNA サンプル A	-	27.22	343.4	-	23.17	6391.5
RNA サンプル B	-	31.70	17.3	-	22.70	8589.7
RNA サンプル C	-	24.62	1946.1	-	22.93	7432.9

（3）相対定量

次に、得られた定量結果をもとに、遺伝子 X の相対量を求めます。解析の手順は、下記の通りです。表の結果を参照しながら、手順を確認してください。

	遺伝子 H	遺伝子 X		
	定量結果*1	定量結果*1	補正値*2	相対量*3
RNA サンプル A	6391.5	343.4	0.054	1.000
RNA サンプル B	8589.7	17.3	0.002	0.037
RNA サンプル C	7432.9	1946.1	0.262	4.874

*1 定量結果

Ct 値を検量線に当てはめて得られた定量結果です。このままでは、遺伝子 X の発現量をサンプル間で直接比較することはできません。

*2 補正値

ハウスキーピング遺伝子の発現量により、RNA 量の補正を行います。補正値は、目的遺伝子（遺伝子 X）の定量結果をハウスキーピング遺伝子（遺伝子 H）の定量結果で割ることにより求められます。

*3 相対量

発現量の差を把握しやすいように、コントロールサンプルを"1"とした場合の相対量を求めます。ここでは、RNA サンプル A をコントロールとし、各サンプルの補正値を RNA サンプル A の補正値で割ることにより、相対量を求めました。

（４）まとめ

相対定量の結果から目的遺伝子 X の発現量は、サンプル A を"1"とした場合、サンプル B、C ではそれぞれ"0.037"、"4.874"に発現量が増減していることが分かりました。

このように、相対定量を行うことで、同一遺伝子の発現量を異なるサンプル間で比較することが可能となります。逆に、異なる遺伝子が同一サンプル内でどのような量比で発現しているかを正確に求めることはできません。相対定量で定量できるものとできないものをよく理解しておくことが重要です。

７．おわりに

以上、リアルタイム PCR について基本的な事項を解説してきました。これから実際に実験を行っていく中で分からないことが出てきたときや、リアルタイム PCR をもっと詳しく知りたいという方は、「リアルタイム PCR 実験ガイド」もご参照ください。定量方法やプライマー設計方法などについて、より詳細に解説しています。また、さまざまなアプリケーションデータも紹介していますので、ぜひ一度ご覧ください。